

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
ORIENTADOR: EDDY JOSÉ FRANCISCO DE OLIVEIRA
ORIENTADA: ANA VALESKA SANTOS DE SOUZA

**Análise *in silico* do DNA Barcode em Diptera caliptrados de interesse forense
pertencente às 4 famílias (Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae)**

Palavras-chave: Moscas, COI, Forense

INTRODUÇÃO

A ordem Diptera constitui uma das maiores ordens de insetos. Estima-se que 150 mil espécies de Diptera, classificadas em cerca de 10 mil gêneros, de 188 famílias, tenham sido descritas mundialmente (Thompson, 2006). Para a região Neotropical, segundo Carvalho & Mello-Patiu (2008), existem cerca de 850 espécies de Muscidae, 800 de Sarcophagidae, 130 de Calliphoridae e 60 de Fanniidae, apesar de alguns outros autores estipularem valores similares para mais ou para menos. Estima-se que essas famílias atinjam cerca de 15% da fauna mundial (Carvalho *et al.* 2002).

Algumas famílias de Diptera apresentam importância ecológica na ciclagem de nutrientes, como é o caso das espécies saprófagas. Dentre essas, se destacam os dípteros muscoídes das famílias Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae e Sarcophagidae (Hövmeyer 2000). Esses dípteros utilizam material orgânico em decomposição para alimentação e ovi/larviposição, por este fato as espécies dessas famílias se adaptam facilmente a ambientes antrópicos, o que os torna insetos considerados cosmopolitas sinantrópicos de importância à saúde pública (Linhares 1981).

Um dos materiais genéticos mais utilizados na identificação de espécies é o DNA mitocondrial (*mtDNA*), pois esta molécula possui algumas características que favorecem a distinção entre elas, dentre as quais é importante ressaltar que além de ser haplóide, tem transmissão materna, não possui recombinação, é pequeno comparado ao DNA nuclear e de simples estruturação (Avise, 1991; Moritz *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1985).

Uma região do *mtDNA*, foi padronizada como sendo o marcador universal para identificação de espécies: o gene citocromo oxidase I (COI) denominado de *DNA Barcode*, que possui sequências que são utilizadas como um código de barras, contendo cerca de 650 pares de bases (Hebert *et al.*, 2003). Estudos comparativos de *DNA Barcode* podem ajudar na identificação de espécies, pois infere exatamente os limites existentes entre elas, podendo ser considerado uma característica taxonômica para estudos posteriores (Smith *et al.*, 2005).

A análise *in silico* é uma área de investigação relativamente nova na biologia, que utiliza sistemas matemáticos e simulações computacionais (Palsson, 2000). Esta abordagem

consiste em selecionar num banco de dados moleculares (sequências) que correspondem, por similaridade, a dois iniciadores “primers” PCR. As regiões correspondentes aos dois iniciadores podem ser localizadas na sequência selecionada de modo que permita a amplificação por PCR, o que obriga a relativa orientação das correspondências e as distâncias entres eles (Ficetola *et al.*, 2010).

METODOLOGIA

COLETA DAS SEQUÊNCIAS:

Utilizamos as espécies identificadas por taxonomia de dois trabalhos realizados por NOVAIS, M. T. N. C. S. & MONTEIRO, T. T. D., como base para coletar sequências do gene CITROCOMO OXIDASE (COI) no CNBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ambos realizados na Universidade de Feira de Santana, Bahia.

ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS:

Na 1ª etapa, foi realizada uma análise do gene total dos indivíduos juntos, onde no MEGA, alinhamos todos os genomas dos indivíduos encontrados via ClustalW, e observados onde havia congruência ou não nos pares de bases, fazendo cortes nesses genomas em sua porção anterior e posterior até ficarem no máximo com 686pb no total. Realizou-se novos cortes, de 000 a 300pb, 301-500pb e 501-686pb, para observação dos pontos de maior congruência e/ou degradação dos genes desses indivíduos.

Fizemos uma Análise Filogenética e a construção de uma árvore de máxima verossimilhança utilizando o Kimura 2-parameter model. Tal processo foi realizado em todos os fragmentos das sequências. A 2ª etapa consistiu nos mesmos procedimentos, porém por família.

Para a terceira etapa, utilizamos o Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html) onde colocamos as sequências encontradas no NCBI de cada indivíduo, separados por suas respectivas famílias, e obtivemos as enzimas e os seus sítios de corte. Numa última análise verificamos os preços das enzimas principais que farão esse processo de divisão das famílias, no site New England biolabs (<https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/restriction-enzyme-digestion/products>) para ter uma margem do gasto financeiro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados, no total de ambos os trabalhos utilizados, 44 espécies pertencentes à 3 das 4 famílias de dípteros de interesse forense, Fanniidae, Calliphoridae e Muscidae. Dessas 44 espécies, 21 (31 indivíduos) apresentavam seus códigos genéticos registrados no NCBI.

Desses 32 códigos encontrados, 16 pertencem à família Calliphoridae, 15 à Muscidae e 1 à Fanniidae. Após as ações realizadas, descritas na metodologia, obtivemos 3 enzimas (SwaI, SacI e DraI) que ao serem utilizadas conjuntamente com outras duas, poderiam identificar rapidamente 2 das 4 famílias.

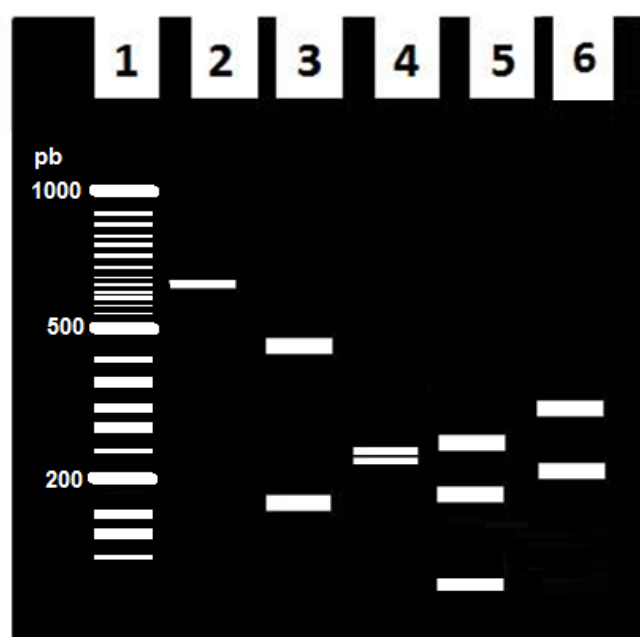


Figura 1. Esquema *in silico* do gel eletroforese do fragmento do gene COI de espécies das famílias Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae. As linhas correspondem: 1) Marcador molecular 50 bp (O'RangeRuler™-Thermofisher®); 2) fragmento sem corte 686 pb; 3) Cmeg, Calliphoridae; 4) Fanniidae; 5) Snud, Muscidae 6) Chom, Calliphoridae.

CONCLUSÕES

* O estudo possibilitou identificar e separar 2 das 4 famílias de Diptera de interesse forense, utilizando uma combinação de 2 enzimas.

* Possivelmente até 3 famílias podem ser identificadas, porém há necessidade de maiores estudos nos espécimes da família Fanniidae.

* Esses dados podem ser utilizados para futuros trabalhos aumentando o número de amostragem, estreitando a análise à pelo menos gênero das 4 famílias.

* Esse estudo permitirá, principalmente, que laboratórios forenses consigam fazer identificações rápidas e de baixo custo utilizando-se desses minis *barcoding*.

REFERÊNCIAS

AVISE, J.C. Tem unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. *Annual Review of Genetics* 25: 45-69, 1991.

CARVALHO, C.J.B., MOURA, M.O., RIBEIRO, P.B. 2002. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 46(2): 107-144.

CARVALHO, C.J.B. & MELLO-PATIU, C.A. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia* 52(3): 390-406.

FICETOLA et al. An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11:434, 2010.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. e deWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: S569-S599, 2003

HÖVEMEYER, K. (2000): Ecology of Diptera. In: PAPP, L.& DARVAS, B. (eds): *Manual of Palaearctic Diptera*. Science Herald, Budapest; pp: 437-489.

LINHARES, A. X. 1981a. Synanthropy of Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 25: 231-243.

LINHARES, A. X. 1981b. Synanthropy of Muscidae, Fanniidae and Anthomyiidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 25: 231-243.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E. e BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292, 1987.

SMITH, M. A.; FISHER, B. L. e HEBERT, P. D. N. DNA Barcoding for effective biodiversity assessment of a hyper diverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360, 1825-1834, 2005.

THOMPSON, F.C. (ed.). 2006. Biosystematic Database of World Diptera. Version 7.5, <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/biosys.htm>. Acessado em 02 de abril de 2008.

WILSON, A. C.; CANN, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEIN, U. B.; HELMBYCHOWSKY, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, L. M.; SAGE, R. D. e STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400, 1985.